

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **ВАЩЕНКО Ольги Валеріївни** «Індивідуальні та спільні взаємодії компонентів лікарських препаратів з модельними ліпідними мембранами», поданої на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Робота **ВАЩЕНКО Ольги Валеріївни** присвячена вивченню молекулярних механізмів дії лікарських препаратів, лікарських речовин та іонів металів на модельні ліпідні мембрани. Сучасні дослідження показують, що для адекватної оцінки терапевтичної ефективності лікарських засобів, для визначення ступеня ризику впливу хімічних агентів, наночастинок, надзвичайно важливою задачею є дослідження молекулярних механізмів взаємного впливу мембранотропного агента та клітинної мембрани.

На сьогодні ще не достатньо переконливим виглядає твердження про те, що при проходженні препарату через ліпідну мембрану, досить складну і важливу органелу клітини, змінюються як структурні характеристики так і функціональні властивості мембрани. Однак в літературі вже встановлено цілий ряд закономірностей, що пов'язують зміну терапевтичної активності препаратів з взаємодією з клітинною мембраною, деякі структурні та функціональні аспекти реальних та модельних мембран в цих процесах, але ця робота тільки розпочинається. Зважаючи на надзвичайну складність реальних мембран, їх динамічну рухливість та змінність, і те, що дослідники відносно недавно стали залучати складні фізичні підходи та методи для дослідження навіть простих моделей мембран, дисертаційна робота Ващенко О.В є **актуальною** та своєчасною.

Актуальність обраної теми дослідження підтверджує її зв'язок з низкою НДР Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України, установи, де виконано роботу –: «Розробка нових наноматеріалів на основі гетероструктурованих рідких кристалів і ліотропних фаз гідратованих фосфоліпідів для застосування в медико-біологічних і біофізичних дослідженнях», № держреєстрації 0113U001842; «Механізми надмолекулярного впорядкування та утворення нанорозмірних гетероструктур в багатокомпонентних рідкокристалічних системах і створення нових функціональних матеріалів на їх основі», № держреєстрації 0112U001903; «Вплив біологічно важливих

молекул та іонного середовища на фазовий стан модельних ліпідних мембран»; «Зміни структурно-функціональних властивостей модельних біомембран за індивідуальної та сукупної дії лікарських субстанцій», № держреєстрації 0113U001836; «Вивчення мембранотропної дії лікарських субстанцій», № держреєстрації 0114U001505; «Специфіка відгуку ліпідного наноматеріалу на присутність люмінесцентних зондів та біологічно активних субстанцій», № держреєстрації 0115U003433; «Створення наноматеріалів з керованою електро-, фото- та рентген-стимульованою активністю», № держреєстрації 0116U002612; «Визначення взаємодії наноносіїв фармпрепаратів з модельними фосфоліпідними мембранами», № держреєстрації 0118U002295.

У дисертаційній роботі Ващенко О.В. на підставі власних та літературних даних запропоновано підхід до вивчення механізмів взаємодії та закономірностей структури ліпідних мембран при дії на них лікарських препаратів та іонів за змінами їх термодинамічних параметрів та модельних розрахунків.

Цікавими результатами роботи вважаю:

1. Підбір параметрів, за якими проведено характеристику взаємодії модельних мембран з речовинами та визначено мембранотропну дію лікарських речовин.

2. Встановлення суттєвої ролі поверхневої щільності заряду іонів компонентів лікарських препаратів при взаємодії з мембраною та оцінка їх критичних значень для катіонів та аніонів.

3. Встановлення ключової ролі зміни гідратації мембрани при мембранотропній дії речовини на поверхню ліпідного бішару або гідрофільної частини, та зміни вільного об'єму мембрани при взаємодії з гідрофобною частиною.

4. Розробку низки методик спільної мембранотропної дії та математичних моделей, які описують взаємодію речовин з мембраною.

Дисертаційна робота Ващенко О.В. складається зі вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел з 565 посилань, 3 додатків, 116 рисунків та 34 таблиць.

У вступі подано всі необхідні формальні дані.

Перший розділ присвячено огляду літератури з опису модельних мембран та її основної структурної складової- ліпідів, їх властивостям та структурам, взаємодіям з лікарськими речовинами. На підставі аналізу даних літератури сформульовано мету дослідження.

У другому розділі описано методики, що застосовувалися, речовини, що досліджувалися (38 лікарських речовин), включаючи приготування зразків модельних мембран (7 видів ліпідів). Основним експериментальним методом дослідження фазового

стану ліпідних мембран під дією лікарських речовин та іонів була диференціальна скануюча калориметрія. Додатково були застосовані такі методи як Фур'є-ІЧ-спектроскопія, малокутове рентгенівське розсіювання, термогравиметричний аналіз, оптична мікроскопія, ізотермічна сорбція, математичне та квантово-хімічне моделювання.

У третьому розділі описано взаємодію лікарських препаратів та їх компонент з гідрофільною та гідрофобною складовою ліпідного бішару. Показано, що суттєва роль при взаємодії з гідрофільною поверхнею належить поверхневій щільності іонів та оцінене їх значення, що складає $\sim 5 \times 10^{-4} \text{ Кл/нм}^2$ для катіонів та $\sim 3 \times 10^{-4} \text{ Кл/нм}^2$ для аніонів. Розглянуто випадки утворення нової фази ліпідів внаслідок обох вищевказаних типів взаємодій.

Показано, що для молекул типу холестеролу, які взаємодіють з гідрофобною частиною бішару, основну роль відіграє конформаційна рухливість молекули.

Для низки водорозчинних речовин визначено параметри гідратації та їх зв'язок з мембранотропними ефектами.

У четвертому розділі проведено аналіз отриманих результатів, на основі якого зроблена класифікація мембранотропних ефектів лікарських речовин -підвищення температури фазового переходу, зниження температури фазового переходу, утворення нової фази. Все це проілюстровано конкретними випадками. Визначено, що однакові мембранотропні ефекти можуть бути викликані різними механізмами дії речовин на мембрану, а саме на її гідрофобну або гідрофільну частини. Для низки речовин різних фармакологічних груп – антибіотики, антимікробної, противірусної, протизапальної дії визначено основні параметри мембранотропної дії. Запропоновано феноменологічні математичні моделі на основі рівняння Клапейрона-Клаузіуса.

П'ятий розділ містить результати досліджень на мембрану спільної мембранотропної дії лікарських речовин та допоміжних речовин, що входять в лікарські препарати. Описано метод квазібінарних фазових діаграм та представлено оригінальну класифікацію мембранотропної дії у термінах антагонізму, синергізму, адитивності та конкуренції (переваги зв'язування з поверхнею або об'ємом мембрани однієї речовини за рахунок іншої). На прикладах галогенідів та нітратів лужних металів показано адитивність мембранотропної дії катіонів та аніонів. Встановлено конкуренцію за зв'язування з мембраною лужних та перехідних металів у досліджених системах. Методом ІЧ-спектроскопії охарактеризовано зміни конформаційної рухливості ліпідів, а також параметри гідратації мембран та компонентів лікарських препаратів. Викладено оригінальну методологію порівняння мембранотропної дії фармпрепаратів-аналогів,

апробовану на препаратах метронідазолу, фенібуту, азитроміцину, тилорону, аспіріну та фенспіриду.

У шостому розділі досліджено взаємодії компонентів лікарських препаратів з багатокомпонентними ліпідними мембранами, що розглядається як випадок спільних взаємодій. Розроблено та охарактеризовано низку багатокомпонентних ліпідних мембран, які за своїм ліпідним складом імітують мембрани деяких видів клітин та органел (ентероцитів, кардіоміоцитів, мембран бактерій, мітохондрій). Проведено порівняльне дослідження взаємодії окремих компонентів лікарських препаратів з мембранами різного складу. Показана можливість кількісної та якісної зміни мембранотропного ефекту при зміні ліпідного складу мембран. Визначено випадки, коли зміна ліпідного складу не впливає на мембранотропну дію речовини (фенспірид), а також, коли один той самий структурний ефект перерозподілення ліпідів між фазами індукований взаємодіями екзогенних речовини з поверхнею або об'ємом мембрани. Встановлено, що експериментально зареєстрований синергічний мембранотропний ефект антибіотика граміцидину S та холестеролу відбувається за механізмом «продукування» вільного об'єму мембрани.

Сьомий розділ присвячено дослідженню кінетичних характеристик мембрани, зокрема, кооперативності. Показано існування максимального розміру кооперативного домену ліпідів у мембрані, який визначає ненульову швидкість фазового переходу, та проведено його оцінку для мембрани дипальмітоїлфосфатидилхоліну. За допомогою використання 5 різних схем спільного внесення до мембрани водорозчинних лікарських речовин тилорону та диметилсульфоксиду у кінетичному режимі (послідовне, спільне, та внесення однієї речовини у мембрану з рівноважним розподілом іншої) встановлено суперпозицію процесів сорбції та трансмембранної дифузії речовин у часі як фактору, що визначає неадитивність мембранотропної дії лікарських речовин за порядком їх уведення до мембрани. Запропоновано феноменологічну математичну модель, яка описує зміну трансмембранної дифузії речовини внаслідок індукованої неоднорідності пакування ліпідів у мембрані, тобто зміною розподілу її вільного об'єму. Окреслено перспективи подальшого розвитку робіт у напрямку дослідження.

У цілому робота виконана на високому науковому рівні з застосуванням складної дослідницької апаратури та математичних моделей, що свідчить про високий фаховий рівень здобувача. Основні результати є **новими** і вперше отриманими.

Всі наукові положення та висновки є **обґрунтованими** завдяки повноті отриманих експериментальних та теоретичних даних, а також завдяки їх порівнянню з результатами інших досліджень.

Достовірність результатів не викликає сумніву, оскільки вони отримані з використанням надійних експериментальних методик, ретельно оброблені та проаналізовані.

Текст дисертації та автореферат добре написані, гарно проілюстровані. Автореферат вірно відображає зміст дисертації. Основні результати, що наведено у роботі, вчасно і повністю опубліковано в 47 наукових працях (22 статей, з них 4 індексуються базою даних Scopus, 3 додаткові публікації та 22 тез конференцій) у вітчизняних та міжнародних виданнях. Робота пройшла **апробацію** на міжнародних наукових конференціях.

Разом з тим, робота не позбавлена деяких недоліків:

1.В авторефераті (стор.2) та тексті дисертації (стор.11-12) при описі тем згідно яких була виконана робота, не зазначені роки.

2.Систематизація ліпідів не була виконана чітко. В роботі не вистачає схем та кореляцій ліпідного складу мембран реальних клітин та використаних моделей а також пояснення чому саме такі ліпіди були використані в модельних експериментах. В чому є перевага застосованого методу дослідження структурної організації ліпідів на моделі бішару? Бажано було б зробити порівняльний аналіз температури фазового переходу із іншими показниками, які пов'язані із структурною організацією ліпідів бішару.

3.Чим відрізняються лікарські препарати та лікарські речовини в тексті роботи.

4.Недостатньо приділена увага оптичним дослідженням, хоча метод коливальної спектроскопії використаний в одному експерименті, але описаний він не найкращим чином, яка концентрація речовин, де спектри цих речовин, як це враховано тощо.

5.В роботі використані такі терміни як «хаотропи» та «космотропи», які в біофізичному дослідженні не є звичними, і які, було б доречно замінити на їх властивості, що б зробило роботу більш доступною для читача; що таке «анізотропія» і для чого цей термін потрібен в роботі. Термін «міжбішарова» вода (стор.88 дисертації), «мультимерна» вода (стор.185) бажано замінити на зрозумілі та конкретні терміни. В роботі багато разів використовується термін «площа перетину» (стор. 107 дис.). Взагалі в методиці Ленгмюра-Блоджетта це називається площею, що займає молекула чи площею під молекулою. Чи це один і той же термін. Термін «холестерин» краще замінити на «холестерол».

6.На стор.124 рис.4.1, класифікація мембранотропних ефектів за механізмами зроблена фігурними стрілками. Чи має це якесь смислове навантаження чи це художнє оформлення. Якщо ні, то краще використовувати звичайні прямі стрілки.

7.Висновки до роботи повинні виглядати як висновки, а не перелік результатів.

8.Чи проводився статистичний аналіз даних, про які йдеться в третьому та четвертому розділах? Це незрозуміло з тексту.

Проте, зазначені недоліки ніяким чином не впливають на загальну високу оцінку роботи.

На підставі всього вищезазначеного вважаю, що дисертаційна робота «Індивідуальні та спільні взаємодії компонентів лікарських препаратів з модельними ліпідними мембранами» є завершеною науковою працею, яка повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р., а її автор, Вашенко Ольга Валеріївна, цілком заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

завідувач відділу фізики біологічних систем

Інституту фізики НАН України,

доктор фізико-математичних наук,

професор

Г.І. Довбешко

Підпис проф. Довбешко Г.І. підтверджую:

Учений секретар

Інституту фізики НАН України



В.С. Манжара